

УДК 576.893.161 : 576.5

К ВОПРОСУ СПЕЦИФИЧНОСТИ ВЗАИМООТНОШЕНИЙ ЛЕЙШМАНИЙ И КЛЕТОК ХОЗЯЕВ IN VITRO

М. А. Савина, В. М. Сафьянова, А. Овезмухамедов

В опытах перекрестного заражения перитонеальных макрофагов мышей лейшманиями рептилий (*L. gymnodactylus*) и свободных клеток перитонеальной полости кавказских агам лейшманиями млекопитающих (*L. major* и *L. donovani*) показана возможность размножения указанных видов в тех и других клетках. Размножение в мышиных макрофагах лейшманий млекопитающих и рептилий происходит более интенсивно, и инвазия сохраняется дольше, чем в клетках рептилий. Выявлены различия во времени интернализации лейшманий рептилий и млекопитающих в клетки рептилий. У первых этот процесс происходит быстрее, чем у вторых, что, возможно, связано с адаптацией к свойственным им хозяевам.

Попытки исследовать взаимоотношения лейшманий с неспецифическими для них хозяевами на клеточном уровне предпринимались и ранее. Белова и соавторы (1964) показали, что лейшмании, выделенные от каспийских гекконов, трансформируются в амastiгоны и могут размножаться в 15 различных культурах клеток млекопитающих и даже в фибробластах куриных эмбрионов. К сожалению, авторы только констатировали этот факт, не приводя показателей инвазии и сроков наблюдения. В клетках саркомы собак Стикера Льюис (Lewis, 1974) наблюдал размножение лейшманий рептилий *Leishmania agamae*, тогда как относящиеся к этому же подроду *Sauroleishmania L. adleri* и *L. hoogstraali* вызывали лишь слабую инвазию этих клеток. Этому же автору удалось заразить лейшманиями млекопитающих *L. mexicana mexicana* мышечные клетки сердца черепах. Однако и здесь автор не сообщает о длительности наблюдения, а также о факте размножения лейшманий в клетках рептилий. Известно также сообщение Вейнмана (Weinman, 1939) о размножении амastiгона *L. tropica* в кусочках селезенки и легкого лягушки, помещенных на NNN-кровяной агар. С другой стороны, Олобо и соавторы (Olobio e. a., 1983) уже через сутки наблюдали дегенерацию *Leishmania* sp., выделенных от ящериц, в перитонеальных макрофагах мышей.

Таким образом, к настоящему времени показана принципиальная возможность заражения лейшманиями *in vitro* клеток неспецифических для них хозяев и размножения в них без детализации характера инвазионного процесса.

Целью нашей работы было исследовать *in vitro* характер паразито-хозяйственных взаимоотношений лейшманий с клетками специфических и неспецифических для них хозяев с первых фаз контакта и в динамике до исхода инвазии и на этой основе попытаться выяснить степень специфичности этих отношений.

МАТЕРИАЛ И МЕТОД

В опытах были использованы следующие виды и штаммы лейшманий: лейшманияи млекопитающих *L. donovani* штамма DD-8, выделенного от больного ребенка в Индии в 1980 г. и полученного от проф. Петерса (W. Peters);

L. major штамма RK-K, выделенного от больного кожным лейшманиозом, заразившегося в Саудовской Аравии и полученного от д-ра Киллика-Кендрика (R. Killick-Kendrick) в 1982 г.; *L. gymnodactyli* штамма 3496-СА, выделенного от степной агамы *Agama sanguinolenta* в Туркмении в 1982 г. Овезмухаммедовым.

Штаммы были взяты в опыт на 2—3-м пассажах после криопрезервации в фазе стационарного роста. В качестве клеток-хозяев использовали перитонеальные макрофаги мышей линии BALB/c и свободные клетки брюшной полости кавказских агам. Таким образом, были поставлены опыты перекрестного заражения клеток млекопитающих лейшманиями рептилий и, наоборот, клеток рептилий — лейшманиями млекопитающих. Для первого опыта были взяты перитонеальные макрофаги мышей, зараженные *L. gymnodactyli*, а в качестве контроля — такие же клетки, зараженные *L. major*. Для второго опыта были использованы свободные клетки брюшной полости агам, зараженные в одном случае *L. major*, а в другом — *L. donovani*, а в качестве контроля — такие же клетки, зараженные *L. gymnodactyli*.

Перитонеальные макрофаги мышей получали без предварительной стимуляции. Клетки от рептилий в достаточном количестве удавалось получить только после стимуляции 1 %-ным раствором крахмала или тиогликолятной средой за 4 дня до опыта. В смывах брюшной полости агам, кроме макрофагов, содержалось значительное количество фибробластов.

Клетки культивировали на покровных стеклах, от мышей — в среде 199 с 20 % бычьей сыворотки, клетки агам — в среде RPMI-1640 с 5—10 % эмбриональной бычьей сыворотки без добавления CO₂. В пробирки сеяли по 2 млн. клеток и заражали промастиготами лейшманий в соотношении 1 : 1. Клетки инкубировали при 32° во всех случаях, кроме одного, где контролем к культуре клеток агам, зараженных *L. donovani* и содержащихся при 32°, служили такие же культуры, содержащиеся при 37°. Препараты фиксировали через 2 ч после заражения, а затем ежедневно до 5—10 сут в разных экспериментах. Одновременно фиксировали 2—3 препарата одной и той же культуры. В каждом препарате просматривали 200—500 клеток. Препараты фиксировали 100-градусным метанолом и окрашивали по Романовскому—Гимза. Ряд препаратов просматривали приживленно с фазовым контрастом.

Для оценки состояния инвазии в культуре клеток подсчитывали процент инвазированных клеток и интенсивность инвазии — среднюю арифметическую числа паразитов на клетку. Учитывали также соотношение амастигот и промастигот, наличие размножающихся и разрушающихся амастигот и максимальное число паразитов в клетке. О размножении амастигот судили по симметрично попарно расположенным ядрам и кинетопластам, скоплениям амастигот в виде кольца или плотного конгломерата, а также по увеличению их количества в клетках. Результаты обработаны статистически с использованием критериев χ² и Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТЫ

В контролльном эксперименте при заражении макрофагов мышей лейшманиями млекопитающих (*L. major*) развитие инвазии прослежено с 2 ч до 12 сут (рис. 1, I, II). Максимум инвазии по показателям интенсивности заражения и проценту зараженных клеток приходился на 2 ч — период завершения фагоцитоза, затем к 2-м суткам следовало снижение уровня инвазии, связанное с интенсивным разрушением амастигот, а к 3-м и 8-м суткам достоверное повышение этих показателей (соответственно χ²=67.8 и 195 при P<0.001), обусловленное размножением амастигот (рис. 1, VII; 2, I; см. вкл.). Следует подчеркнуть, что размножение амастигот *L. major* наблюдалось на протяжении всех 12 сут опыта, причем процент амастигот увеличивался, достигая максимума

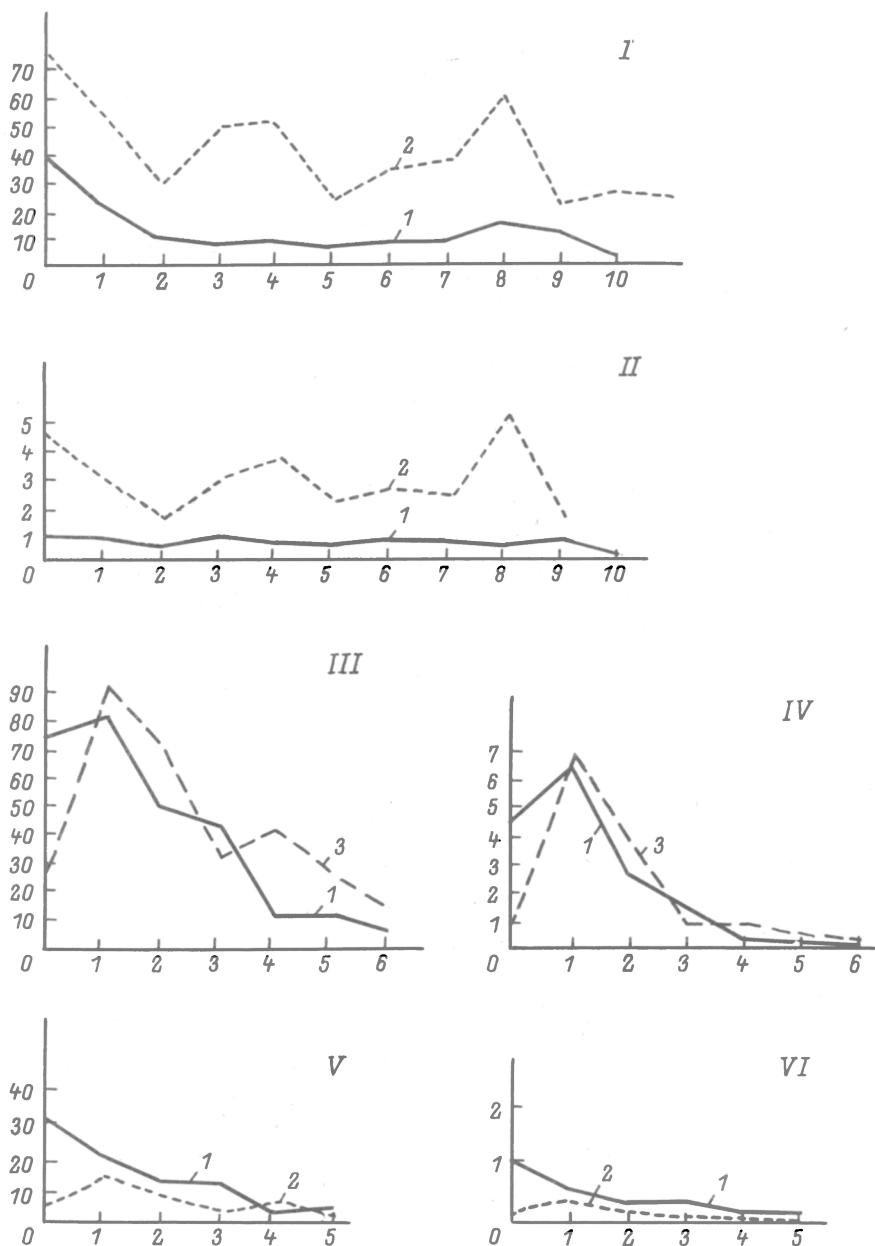


Рис. 1. Развитие инвазии в макрофагах мышей и кавказских агам, вызванной лейшманиями млекопитающих и рептилий.

I — процент зараженных макрофагов мышей линии BALB/c лейшманиями *L. gymnodactylis* и *L. major*, по оси ординат — процент зараженных клеток; II — интенсивность заражения этих же макрофагов *L. gymnodactylis* и *L. major*, по оси ординат — средняя арифметическая числа лейшманий в клетке; III — процент зараженных клеток перitoneальной полости кавказских агам *L. gymnodactylis* и *L. donovani*, по оси ординат — процент зараженных клеток; IV — интенсивность заражения этих же клеток *L. gymnodactylis* и *L. donovani*, по оси ординат — средняя арифметическая числа лейшманий в клетке; V — процент зараженных клеток перitoneальной полости кавказских агам *L. gymnodactylis* и *L. major*, по оси ординат — процент зараженных клеток; VI — интенсивность заражения этих же клеток *L. gymnodactylis* и *L. major*, по оси ординат — средняя арифметическая числа лейшманий в клетке. 1 — *L. gymnodactylis*; 2 — *L. major*; 3 — *L. donovani*. По оси абсцисс — время в сутках, ноль соответствует 2 ч.

(97 %) к 10-му дню. Одновременно постоянно обнаруживались промастиготы, не только внутри, но и вне клеток, которые, вероятно, трансформировались из амастигот, освободившихся из разрушенных клеток. У интенсивно инвазированных клеток ядро имело сморщеный и даже деформированный вид (рис. 1, VII; 2, 2). На 12-е сутки промастиготы составляли 11.4 % всех паразитов, что, видимо, указывает на усилившееся разрушение клеток. Максимальная зараженность отдельных клеток составляла 30—70 паразитов.

При параллельном заражении мышиных макрофагов лейшманиями рептилий (*L. gymnodactyli*) исходный уровень инвазии (через 2 ч) оказался ниже, чем в приведенном контроле (рис. 1, I, II). Позднее он оставался стабильно низким и практически не изменялся до конца наблюдений.

У лейшманий рептилий, как и у *L. major*, промастиготы активно трансформировались в амастиготы и уже через 2 ч они составляли 72 %, а в дальнейшем их процент был не ниже, чем у *L. major*. Однако в отличие от последних размножающиеся амастиготы *L. gymnodactyli* выявлялись лишь с 4-х суток после заражения (рис. 1, VII; 2, 3) и до конца наблюдений (рис. 1, VII; 2, 4). Обращало на себя внимание наличие отдельных интенсивно инвазированных клеток, в которых насчитывалось 4—7 десятков лейшманий (рис. 1, VII; 2, 5). При этом соседние клетки часто были совершенно свободны от паразитов. При прижизненном наблюдении с фазовым контрастом подвижные промастиготы *L. gymnodactyli* в вакуолях мышиных макрофагов обнаруживались до 7-х суток с момента заражения.

В культуре клеток брюшной полости кавказских агам, зараженных лейшманиями млекопитающих (*L. donovani*), выявилась принципиально иная динамика инвазии на первых фазах контакта с клетками (рис. 1, III, IV). В культурах, содержащихся при 32°, инвазия достигала максимума только через сутки с момента заражения, что, видимо, обусловлено более поздним завершением интернализации лейшманий. Различия в проценте и интенсивности зараженности клеток через 2 ч и 1 сут статистически достоверны (соответственно $\chi^2=221$ при $P<0.001$ и $t=17.9$ при $P<0.001$).

Инвазирование этих же клеток рептильным штаммом (рис. 1, III, IV) происходило более активно: процент зараженных клеток и интенсивность инвазии оказались высоки уже через 2 ч с момента заражения. Через 1 сут показатели инвазии еще более возросли. Различия в показателях через 2 ч и 1 сут менее выражены, чем у *L. donovani*, но также статистически достоверны ($\chi^2=4,3$; $P<0,05$ и $t=4,2$; $P<0,001$). На 2-е и 3-и сутки происходит постепенное снижение уровня инвазии клеток обоими видами лейшманий, однако более медленное, чем в макрофагах мышей. В последующие дни снижение продолжалось, достигнув минимума к 6-м суткам. Уровень численности лейшманий рептилий в специфическом хозяине оказался ниже, чем в неспецифическом.

L. donovani, попавшие в клетки рептилий, превращаются в амастиготы, причем высокий уровень их достигается только к 3—4-м суткам с момента заражения. Размножающиеся амастиготы мы выявляли лишь на 1-е, 2-е, 5-е и 6-е сутки. Несмотря на наличие отдельных размножающихся амастигот, накопления *L. donovani* в клетках агам не происходило. Процент разрушающихся паразитов со временем нарастал, и они постепенно элиминировались. Максимально в клетках в первые дни насчитывали до 26 амастигот, а в 3 последних — не более 11. При культивировании клеток агам, зараженных *L. donovani*, при 37° в их морфологии не обнаружено отличий от клеток, инкубированных при 32°. При сходном характере динамики инвазирования клеток в этих условиях процент и интенсивность их заражения оказались значительно ниже, чем при 32°.

Динамика паразитирования лейшманий рептилий в клетках агам со 2-х суток после заражения не отличалась от таковой *L. donovani*. Однако размножение амастигот *L. gymnodactyli* наблюдали на всем протяжении опыта (рис. 1, VII;

2, 6, 7). Массовое разрушение амastiгоут также приходилось на 4-е и 5-е сутки.

В другом аналогичном опыте заражали клетки перitoneальной полости агам *L. major* и *L. gymnodactyli*. В этом случае также наблюдали различия в показателях, характеризующих фазу интернализации паразитов этих видов (рис. 1, V, VI). Проникновение *L. major* в клетки завершалось только через 1 сут. Различия процента и интенсивности заражения клеток *L. major* через 2 ч и 1 сут статистически достоверны (соответственно $\chi^2=17.6$; $P<0.001$, $t=2.8$; $P<0.01$). Напротив, максимальная инвазия клеток агам *L. gymnodactyli* достигалась уже через 2 ч, а через 1 сут ее уровень статистически достоверно снизился ($\chi^2=18.4$; $P<0.001$ и $t=3.8$; $P<0.001$). Хотя деление амastiгоут обоих видов происходило, накопления их по ходу инвазии не наблюдалось (рис. 1, VII; 2, 8, 9).

ОБСУЖДЕНИЕ

В результате проведенных исследований была подтверждена возможность проникновения промастигоут лейшманий в клетки неспецифического для них хозяина, перехода в амastiгоут и размножения в них. Однако на первых фазах взаимодействия лейшманий с клетками специфических и неспецифических для них хозяев выявились определенные различия. Оказалось, что активность интернализации промастигоут в клетки специфического для них хозяина была выше, чем в клетки неспецифического. Особенно сильно это проявилось в культуре клеток брюшной полости агам. Менее активная, чем у *L. gymnodactyli*, интернализация наблюдалась как у *L. major*, так и *L. donovani*. Возможно, что этот факт обусловлен некоторой избирательностью фагоцитоза разных видов лейшманий макрофагами специфических и неспецифических для них хозяев, что отмечал Ардеали (Ardehali, 1978). Не исключена также частичная роль активного проникновения лейшманий в клетки (особенно в фибробласты агам), способность к которому неодинакова у разных видов паразитов (Chang, 1978).

Различия в состоянии популяций возбудителя в клетках специфического и неспецифического для них хозяина проявилась и на более поздних стадиях взаимодействия. Уровень численности *L. major* в клетках мышей до конца наблюдений оказался выше, чем у *L. gymnodactyli*. В отличие от первых у *L. gymnodactyli* размножающиеся амastiгоуты появились только с 4-го дня от момента заражения, а затем обнаруживались до конца опыта. В клетках агам динамика численности всех трех видов оказалась сходной, но размножающиеся амastiгоуты лейшманий млекопитающих найдены не во все сроки наблюдения, тогда как рептилий — постоянно. Несмотря на наличие размножающихся амastiгоут лейшманий, повышения их численности в клетках рептилий не происходило, и инвазия элиминировалась к 5—6-му дням, т. е. переваривающая способность макрофагов агам оказалась выше, чем макрофагов мышей.

Таким образом, определенная степень специфичности взаимоотношений паразита с клеткой проявилась как на стадии внедрения, так и размножения в клетке.

Л и т е р а т у р а

Белова Е. М., С. Е. Глейberman, В. М. Сафьянова. Предварительные итоги изучения лептомонад, обнаруживаемых у гекконов в Туркменской ССР. — Здравоохранение Туркменистана, 1964, № 9, с. 29—34.
Ardehali S. M., Khoubayat K. Uptake of different Leishmania by mouse peritoneal exudate cells. — Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg., 1978, vol. 72, N 6, p. 645—646.
Chang K.-P. Leishmania infection of human skin fibroblasts in vitro: absence of phagolisosomal fusion after induced phagocytosis of promastigotes and their intracellular transformation. — Am. J. Trop. Med. Hyg., 1978, vol. 27, N 6, p. 1084—1096.

Lewis D. H. Infection of tissue culture of low phagocytic ability by Leishmania mexicana mexicana. — Ann. Trop. Med. Parasitol., 1974, vol. 68, N 3, p. 327—336.
Olobio J. O., Mutinga M. J. Uptake of promastigotes of a lizard Leishmania sp. and Leishmania donovani by mouse peritoneal macrophages. — Acta tropica, 1983, vol. 40, N 1, p. 89—91.
Weinman D. Factors affecting the morphology of Leishmania tropica. The production of Leishmania forms in cultures. — Parasitology, 1939, vol. 31, N 2, p. 185—192.

НИИЭМ им. Н. Ф. Гамалеи АМН СССР, Москва;
Институт зоологии АН ТССР, Ашхабад

Поступила 11. 11. 1985
после доработки 12. 06. 1987

SPECIFICITY OF INTERRELATIONS BETWEEN LEISHMANIA
AND CELLS-HOSTS IN VITRO

M. A. Savina, V. M. Safanova, A. Ovezmukhammedov

S U M M A R Y

Experiments on cross infection of peritoneal macrophages of mice with Leishmania of reptiles *L. gymnodactyli* and free cells of abdominal cavity of caucasian *Agama* (some part of which is composed by fibroblasts) with Leishmania of mammals *L. major* and *L. donovani* have shown the possibility of reproduction of the above species both in reptiles and mammals. The persistence of *L. gymnodactyli* and *L. major* in macrophags of mice was traced up to 10 days, the abundance of *L. gymnodactyli* during the whole period of observations being lower than that of *L. major*. The abundance of the above Leishmania in these cells happened to be higher than in the cells of reptiles. In the cells of reptiles the infection with these three species of Leishmania was eliminated by 5—6 days. More activite internalization of Leishmania of reptiles into cells of reptiles as compared to Leishmania of mammals was revealed that, apparently, reflects a definite degree of their adaptation to existence in reptiles *in vivo*.

Вклейка к ст. М. А. Савиной и др.

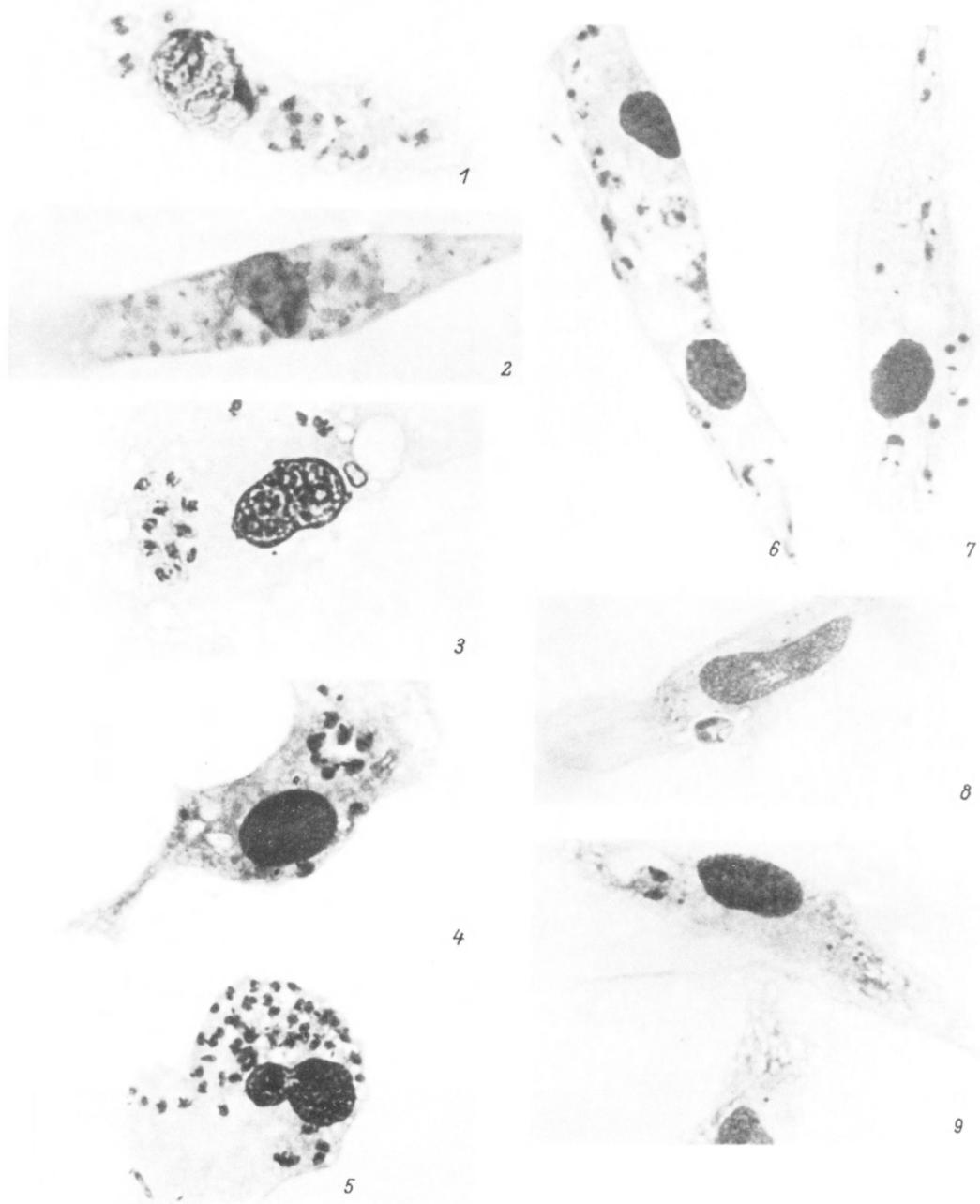


Рис. 2. Макрофаги мышей и кавказских агам, зараженные лейшманиями млекопитающих и рептилий.

1 — размножающиеся амastiгоны *L. major* в разрушающемся макрофаге мыши на 8-е сутки после заражения; 2 — интенсивно инвазированный разрушающимися амastiгонаами *L. major* макрофаг мыши с деформированным ядром на 8-е сутки после заражения; 3 — размножающиеся амastiгоны *L. gymnodactyli* в разрушающемся макрофаге мыши; 4 — группа размножающихся амastiгона *L. gymnodactyli* в макрофаге мыши через 8 сут после заражения; 5 — интенсивно инвазированный *L. gymnodactyli* макрофаг мыши через 3 сут после заражения; 6, 7 — лейшмания *L. gymnodactyli* в клетках из брюшной полости кавказской агамы через 3 сут после заражения; 8, 9 — делящиеся амastiгоны *L. major* в клетках из брюшной полости кавказской агамы через 4 сут после заражения.